ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE
ANNEE 1984 N° 56

PLACE ET UTILISATION DE LA COLORIMETRIE EN CLIENTELE VETERINAIRE

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE
DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement en 1984
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

Pascal, Christian, Daniel BOURGUIGNAT
Né le 30 Mars 1954 à PARIS(17e)

JURY : **MM. DOUSTE-BLAZY** *Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*
RICO
GUELFI } *Professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

Association des Elèves
E.N.V.T.

UNIV. LIBRARY

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE
ANNEE 1984
N° 56

PLACE ET UTILISATION DE LA COLORIMETRIE EN CLIENTELE VETERINAIRE

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE
DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement en 1984

devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

Pascal, Christian, Daniel BOURGUIGNAT
Né le 30 Mars 1954 à PARIS(17e)

JURY : **MM. DOUSTE-BLAZY** *Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*
RICO, **GUELFI** *Professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

Association des Elèves
E.N.V.T.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. LAUTIE
Directeur honoraire ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires ..... MM. BRIZARD
SAURAT
GODFRAIN

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... Mme BURGAT-SACAZE
Maître-Assistant ..... M. PETIT

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... MM. RICO
Professeur sans chaire ..... BRAUN
Maître-Assistant agrégé ..... BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... MM. PAVAUX
Maître-Assistant Agrégé ..... LIGNEREUX
Maître-Assistant Agrégé ..... SAUTET

Organogénèse – Tératologie
Anatomie générale – Anatomie appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... MM. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé ..... TOUTAIN

Physiologie – Pharmacodynamie
Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE – ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... MM. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... CABANIE
Maître-Assistant Agrégé ..... MAGNOL

Histologie – Embryologie
Anatomie Pathologique – Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... MM. LABIE
Maître de conférences ..... EECKHOUTTE
Maître-Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et
Technologie des denrées alimentaires
d'origine animale – Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... MM. DORCHIES
Maître de Conférences ..... FRANC
Maître-Assistant Agrégé ..... DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée – Ecologie
Parasitologie externe – Dermatologie
Parasitologie interne – Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... MM. LESCURE
Professeur sans chaire ..... GUELFI
Maître-Assistant agrégé ..... REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des
Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... MM. TOURNUT
Maître de Conférence ..... BEZILLE
Maître-Assistant ..... JOUGLAR
Maître-Assistant ..... SCHELCHER

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de basse-cour
Clinique – Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... MM. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... GENEVOIS
Maître-Assistant Agrégé ..... AUTEFAGE
Maître Assistant ..... FAYOLLE

Propédeutique et Sémiologie chirurgicale
Radiologie – Technique chirurgicale
Anesthésiologie – Pathologie chirurgicale
Traumatologie – Podologie orthopédique – Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... MM. FERNEY
Professeur sans chaire ..... ROYAL
Maître-Assistant ..... BERTHELOT

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle
Sémiologie et propédeutique
Pathologie de la Reproduction
Obstétrique et pathologie du nouveau-né
Clinique – Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES – ZOONOSES LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... MM. CHANTAL
Maître-Assistant ..... PICAVET
Maître-Assistant ..... LACHERETZ

Epidémiologie – Maladie Contagieuses
Zoonoses – Législation sanitaire – Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE – MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... MM. LAUTIE
Maître de conférences ..... EUZEBY
Maître-Assistant ..... MILON

Microbiologie – Immunologie
Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... MM. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... DARRE
Maître-Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie – Génétique animale
Extérieur – Zootechnie et économie générales
Ethologie appliquée, Sciences, Techniques
Economie de l'Elevage et des Productions animales
Insémination artificielle – Organisation de l'Elevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... MM. FALIU
Professeur sans chaire ..... GRIESS
Maître-Assistant ..... ENJALBERT

Botanique appliquée et bromatologie
Agronomie – Alimentation

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 Mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 Juin 1924.

PLACE ET UTILISATION DE LA COLORIMETRIE

EN CLIENTELE VETERINAIRE

A ma femme
A mes enfants
A ma famille et mes amis

Toute ma gratitude pour leur aide
et l'amitié qu'ils m'ont témoignée.

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOUSTE-BLAZY
de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

MONSIEUR LE PROFESSEUR RICO
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUELFI
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

A l'ensemble du Personnel du Laboratoire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

PLACE ET UTILISATION DE LA COLORIMETRIE EN CLIENTELE VETERINAIRE

PLAN GENERAL

INTRODUCTION

....

PREMIERE PARTIE

BASES THEORIQUES DE LA PHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE

....

DEUXIEME PARTIE

L' EQUIPEMENT

....

TROISIEME PARTIE

EXPLOITATION D'UN COLORIMETRE

....

CONCLUSION

....

BIBLIOGRAPHIE

....

INTRODUCTION

Découverte en 1768, par le mathématicien français Jean-Henri Lambert, la photométrie d'absorption moléculaire est aujourd'hui utilisée dans de nombreux secteurs.

Son apparition dans le domaine vétérinaire est assez récente et a été en grande partie conditionnée par de nouvelles exigences telles que précision et rapidité des diagnostics, complexité des pathologies ...

Devant la prolifération de ces nouveaux appareils, une étude de leur fonctionnement, de leur choix, et de leur maniement nous est apparue nécessaire. Le but fixé n'est pas de faire un traité de photométrie d'absorption moléculaire mais d'insister avant tout sur les aspects pratiques de celle-ci en clientèle : c'est en quelque sorte une "vulgarisation pour la clientèle vétérinaire".

Pour cela, nous envisagerons en premier lieu, les aspects techniques de la colorimétrie, au travers des lois fondamentales qui la régissent et de l'étude théorique des appareils. Dans une deuxième partie, nous étudierons les différents types d'appareils proposés sur le marché ainsi que leurs accessoires et les réactifs utilisés. Dans une troisième et dernière partie, nous exposerons différents aspects pratiques.

PREMIERE PARTIE

BASES THEORIQUES DE LA PHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE

I - LOIS FONDAMENTALES DE LA PHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE

I-1 Les radiations lumineuses

I-2 Lois fondamentales de l'absorption

I-2-1 Loi de Beer-Lambert
I-2-2 Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

I-3 Applications pratiques

II -APPAREILLAGE

II-1 Sructure générale d'un photomètre

II-2 Eléments constitutifs

III-GENERALITES SUR LES REACTIONS DE DOSAGE

III-1 Dosage en point final

III-2 Dosage "cinétique"

III-3 Eléments de choix d'une méthode de dosage

Le vocabulaire et les symboles utilisés dans cette étude font l'objet d'un document AFNOR NF T01 - 030.
En outre,le terme de spectrophotométrie d'absorption moléculaire sera parfois remplacé par les termes de photométrie ou de colorimétrie qui, bien qu'impropres, sont souvent employés comme synonymes.

I- LOIS FONDAMENTALES DE LA PHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE.

La photométrie d'absorption moléculaire repose sur l'absorption de radiations par des solutions.

Sans vouloir faire une étude exhaustive des bases théoriques détaillées par ailleurs (1 à 3, 5, 8, 17, 19, 26.), nous envisagerons brièvement la nature des radiations lumineuses, puis les lois de l'absorption, et enfin, les applications pratiques à en retenir.

I-1 LES RADIATIONS LUMINEUSES

La lumière dite "blanche" est un mélange complexe de rayonnements de longueurs d'ondes différentes et donc de fréquences différentes

(nous rappelons que : $c = \lambda \cdot \nu$

c : vitesse de la lumière en $L.T^{-1}$

λ : longueur d'onde en L

ν : fréquence en T^{-1})

Elle est constituée par l'ensemble des rayonnements visibles par l'oeil humain et s'étage schématiquement entre 400 et 800 nm, entre le violet et le rouge (figure 1).

Un tel spectre est dit "CONTINU" car constitué d'une infinité de radiations juxtaposées.
Il existe aussi des spectres "DISCONTINUS", composés d'un nombre fini et limité de radiations simples : c'est par exemple le cas du spectre d'émission des lampes à vapeur de mercure qui ne produisent que certaines "raies" caractéristiques, en particulier, à 334, 340, 366, 405, 436, 492, 546, 578nm.

NORME FRANÇAISE

ENREGISTRÉE

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLÉCULAIRE

VOCABULAIRE ET GÉNÉRALITÉS

NF T 01-030

Juillet 1976

1 OBJET

La présente norme a pour objet de définir un certain nombre de termes et de rappeler quelques généralités sur la spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans les solutions.

2 DÉFINITIONS, TERMES, SYMBOLES, FORMULES ET UNITÉS

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire est une technique applicable à l'analyse qualitative et à l'analyse quantitative qui permet la mesure de la concentration d'un composé dissous dans une solution ; elle s'effectue dans le domaine proche ultra-violet, visible et proche infra-rouge, ce qui correspond à l'intervalle des longueurs d'onde comprises entre environ 180 et 1 000 nm.

Les termes répertoriés dans les tableaux ci-après ont été classés de manière à avoir été définis avant d'être utilisés dans des définitions ultérieures.

Le tableau 1 est donné à titre de rappel et de justification ; il rassemble les termes du Vocabulaire International de l'Éclairage dont il a été tenu compte pour le choix des termes et l'établissement de définitions faisant l'objet du tableau 2. Dans ce tableau :

- les termes 1 à 7 correspondent à l'interaction d'un rayonnement électromagnétique quelconque mais de nature optique (UV, VI, IR) avec un milieu quelconque observé de l'extérieur
- les termes 8 à 10 correspondent à l'interaction d'un rayonnement électromagnétique quelconque mais de nature optique (UV, VI, IR) avec un milieu à faces planes et parallèles, homogène, isotrope, non luminescent et non diffusant, observé de l'intérieur,

Le tableau 2 répond à l'objet de la présente norme et concerne donc l'interaction d'un faisceau de radiations lumineuses monochromatiques frappant sous une incidence normale, un milieu constitué par une solution homogène, isotrope, non luminescente et non diffusante contenue dans une cuve optique (à deux faces planes et parallèles). Dans ce tableau :

- les termes 13 et 14 correspondent à l'aspect théorique et constituent une simple adaptation au cas particulier de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire des termes 8 et 10.
- les termes 15 et 18 correspondent aux phénomènes et aux mesures réelles
- les termes 19 et 20 sont relatifs au mode d'expression des résultats.

Enregistrée par décision du 76.07.16

La présente norme remplace la norme de même indice enregistrée le 11 janvier 1972

AFNOR 1976
Droits de reproduction et de traduction réservés pour tous pays

NF T 01-030 1er Tirage 76-07

Absorption spectrophotometry Glossary and general

Spektralphotometrische absorption : Terminologie und Allgemeines

Éditée par L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) - Tour EUROPE CEDEX 7 92080 PARIS LA DÉFENSE — Tél. (1) 788-11-11

TABLEAU 1 - RAPPEL DE DÉFINITIONS CONCERNANT LE RAYONNEMENT ET LES PROPRIÉTÉS OPTIQUES DE LA MATIÈRE

N°	TERME	DÉFINITION	SYMBOLE	FORMULE	UNITÉ
1	flux incident (*)	flux énergétique ou lumineux du rayonnement frappant une face externe du milieu	Φ_0		W ou lm
2	flux transmis (*)	flux énergétique ou lumineux du rayonnement émergeant du milieu.	Φ		W ou lm
3	transmission (CIE 45-05-65)	passage d'un rayonnement à travers un milieu, sans changement de fréquence des radiations monochromatiques qui le composent.			
4	facteur de transmission (CIE 45-20-085)	rapport du flux énergétique ou lumineux transmis au flux incident.	τ	$\tau = \Phi/\Phi_0$	
5	densité optique (CIE 45-20-100)	logarithme décimal de l'inverse du facteur de transmission.	D	$D = \lg 1/\tau$	
6	absorption (CIE 45-05-070)	transformation d'énergie rayonnante en une autre forme d'énergie par interaction avec la matière.			
7	facteur d'absorption (CIE 45-20-115)	rapport du flux énergétique ou lumineux absorbé au flux incident	α	$\frac{\Phi_0 - \Phi}{\Phi_0}$	
8	facteur de transmission interne (d'une lame homogène non diffusante) (CIE 45-20-090)	rapport du flux énergétique ou lumineux atteignant la face de sortie de la lame, au flux ayant traversé la face d'entrée.	τ_i		
9	densité optique interne (CIE 45-20-105)	logarithme décimal de l'inverse du facteur de transmission interne.	D_i	$D_i = \lg \frac{1}{\tau_i}$	
10	facteur d'absorption interne (d'une lame homogène non diffusante) (CIE 45-20-120)	rapport du flux énergétique ou lumineux absorbé entre les faces, d'entrée et de sortie de la lame, au flux ayant traversé la face d'entrée.	α_i		

Les références entre parenthèses sont celles du « Vocabulaire International de l'Éclairage » publication CIE N° 17 (E-1.1) 1970.

(*) *La définition de ce terme, utilisé mais non défini dans le Vocabulaire International de l'Éclairage, a été déduite des définitions suivantes*

TABLEAU 2 - TERMES ET DÉFINITIONS RELATIFS A LA SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION MOLÉCULAIRE

N°	TERME	DÉFINITION	SYMBOLE	FORMULE	UNITÉ
11	épaisseur (*)	distance entre les faces internes planes et parallèles d'une cuve optique.	l		mm
12	parcours optique (*)	distance parcourue par un rayon lumineux entre les faces d'entrée et de sortie d'une solution placée dans une cuve optique.	p		mm
13	facteur de transmission interne (**)	rapport du flux énergétique ou lumineux atteignant la face de sortie d'une solution placée dans une cuve optique, au flux ayant traversé sa face d'entrée.	τ_i		
14	facteur d'absorption interne (**)	rapport du flux énergétique ou lumineux absorbé entre les faces d'entrée et de sortie d'une solution placée dans une cuve optique, au flux ayant traversé sa face d'entrée.	α_i		
15	flux de référence	flux énergétique du rayonnement monochromatique transmis par la cuve optique contenant la solution utilisée comme référence, et atteignant le capteur.	Φ_r		W
16	flux de mesure	flux énergétique du rayonnement monochromatique transmis par la cuve optique contenant la solution sur laquelle est faite la mesure et atteignant le capteur.	Φ_s		W
17	densité optique interne partielle ou absorbance (***)	fraction de la densité optique interne d'une solution due à certains de ses constituants. L'absorbance d'une solution pour des conditions expérimentales données est donc la différence entre sa densité optique interne et celle de la solution utilisée comme référence	A	$\lg \frac{\Phi_r}{\Phi_s}$	
18	densité optique interne partielle spécifique ou absorbance spécifique (***)	densité optique interne partielle d'une solution due à un seul de ses constituants (composé dissous à doser par exemple).	A_s	$\lg \frac{\Phi_r}{\Phi_s}$	

(*) *Les termes 11 et 12 sont équivalents lorsque le flux lumineux incident est normal. Le produit du parcours optique par l'indice de réfraction de la solution absorbante est appelé chemin optique.*

(**) *Le facteur de transmission interne et le facteur d'absorption interne sont usuellement exprimés en pourcentage.*

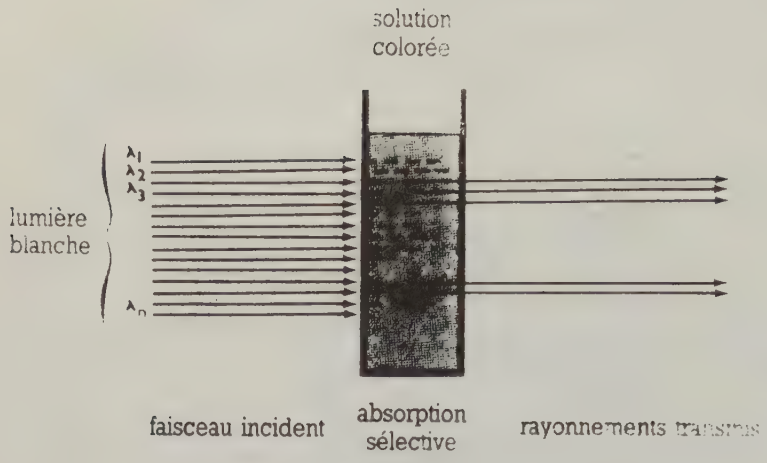
(***) *Pour des raisons de commodité de langage les termes absorbance et absorbance spécifique seront utilisés à la place de densité optique interne partielle et densité optique interne partielle spécifique.*

TABLEAU 2 - (suite)

N°	TERME	DÉFINITION	SYMBOLE	FORMULE	UNITÉ
19	concentration	quotient de la quantité de composé dissous par le volume de la solution. Selon les unités utilisées, on distingue :			
19.1	concentration en masse	quotient de la masse du composé dissous par le volume de la solution	ρ		kg/m^3
19.2	concentration molaire volumique (molarité)	quotient de la quantité de matière en solution par le volume de la solution.	c		mol/l
20	coefficient d'absorbance (spécifique)	absorbance spécifique par unité d'épaisseur et par unité de concentration d'un composé dissous considéré **NOTE :** par extension et usuellement la concentration utilisée est souvent celle de l'élément ou de la molécule à doser. Selon les unités utilisées, on distingue :			
20.1	coefficient d'absorbance volumique	coefficient d'absorbance pour lequel l'épaisseur est exprimée usuellement en centimètres et la concentration en grammes de composé dissous par litre de solution.	a_v	$\frac{A_S}{l\rho}$	$cm^{-1}g^{-1}l$
20.2	coefficient d'absorbance molaire (*)	coefficient d'absorbance pour lequel l'épaisseur est exprimée usuellement en centimètres et la concentration en moles de composé dissous par litre de solution.	a_m	$\frac{A_S}{lc}$	$cm^{-1}mol^{-1}l$

Le coefficient d'absorbance molaire est souvent appelé « coefficient d'extinction » et désigné par le symbole ε

NOTE Les unités employées pour exprimer la concentration et l'épaisseur doivent être précisées, ainsi que la longueur d'onde de mesure, la température des solutions et si possible la largeur de la bande passante (définie par ailleurs dans la norme NF T 01-031 « Appareillage »). Comme l'absorbance due à un composé dépend de l'état dans lequel ce composé se trouve dans la solution, son coefficient d'absorbance n'est parfaitement défini que si la nature du solvant et les propriétés physicochimiques de la solution sont précisées.



spectres d'absorption et de transmission
exemple : spectre d'absorption de l'hémoglobine (oxy-)

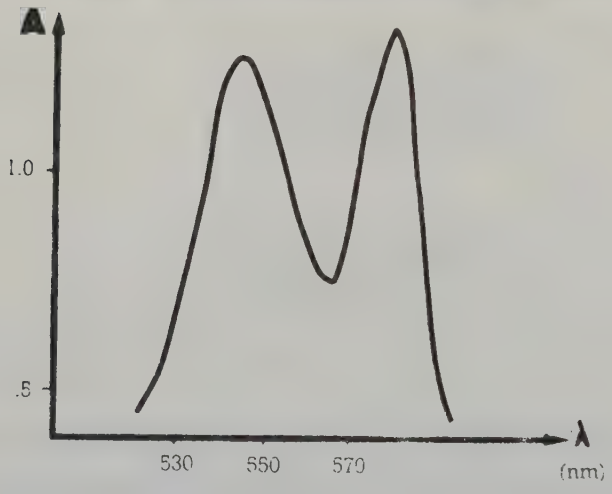


figure 2. Absorption de la lumière

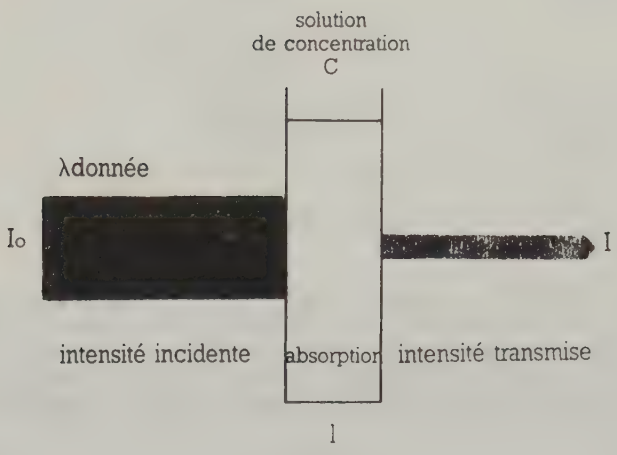
Dans la pratique, outre le domaine visible, on exploite aussi très largement le proche ultra-violet jusqu'au voisinage de 340 nm, maximum d'absorption des coenzymes pyrimidiques réduites NADH et NADPH très largement utilisées dans les techniques enzymatiques.

Les objets colorés, et aussi les solutions colorées, ne le sont que parce qu'ils absorbent sélectivement une partie des radiations du spectre visible ne laissant à la vision de l'observateur que les radiations non absorbées (d'où la notion de couleur complémentaire) (figure 2).

On peut aussi déterminer les SPECTRES D'ABSORPTION de différentes solutions, c'est à dire la proportion d'absorption de chaque rayonnement du spectre ; s'y opposent les SPECTRES DE TRANSMISSION, c'est à dire les rayonnements non absorbés qui confèrent sa coloration au milieu.

Un exemple de spectre d'absorption est donné dans la figure 2 pour une solution d'hémoglobine.

La sélectivité d'absorption des solutions est mise à profit en photométrie d'absorption moléculaire, où pour doser un composé donné, on se place à une longueur d'onde définie égale ou voisine du maximum d'absorption du dit composé ; pour ce faire nous verrons ultérieurement qu'il est nécessaire de disposer de systèmes selectionnant les longueurs d'ondes : les monochromateurs.



$$\text{absorption } A = \frac{I_o - I}{I_o} \qquad \text{transmission } T = \frac{I}{I_o}$$

$$\text{loi de Lambert-Beer : } \quad T = e^{-kcl}$$

$$D.O = \log \frac{1}{T} = k.c.l$$

D.O.	densité optique	sans unité
k	coefficient d'extruction molaire spécifique	$L^2.S^{-1}$ $S.L^{-3}$
c	concentration	L
l	chemin optique	

figure 3. Absorption d'un faisceau monochromatique
Loi de BEER-LAMBERT.Densité optique

I-2 LOIS FONDAMENTALES DE L'ABSORPTION

I-2-1 Loi de Beer-Lambert

Elle résulte de la justaposition de deux lois émises successivement par Beer et Lambert et ne s'applique qu'aux radiations monochromatiques, c'est à dire aux radiations constituées d'un rayonnement de longueur d'onde parfaitement définie et unique.

La transmission, c'est à dire le rapport de l'intensité lumineuse ayant franchi la solution colorée sur l'intensité lumineuse incidente, est une fonction logarithmique décroissante du chemin optique et de la concentration.

La manipulation des exponentielles étant délicate, on a en général recours à la notion de densité optique ou DO, encore appelée absorbance ou extinction : DO, logarithme décimal de l'inverse de la transmission est une fonction croissante de la concentration et du chemin optique (figure 3).

1-2-2 Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

La loi précédemment énoncée n'est applicable que sous certaines conditions qui doivent impérativement être respectées :

- Monochromatisme aussi strict que possible du rayonnement lumineux: la loi de Beer-Lambert ne s'applique en théorie qu'aux radiations simples. En pratique, il convient d'utiliser des monochromateurs sélectionnant une portion de spectre aussi limitée que possible, c'est à dire ayant une bande passante étroite. Ce n'est que dans ces conditions que la DO peut être une fonction LINEAIRE de la concentration (figure 4).

- Solutions diluées : les solutions concentrées ne suivent plus la loi de Beer-Lambert car l'absorption augmente plus vite que la concentration.
Cependant, si la concentration reste inférieure à 10^{-2}mol.L^{-1}, il est rare que l'erreur atteigne 0,1%.

Notons par ailleurs que les modifications du PH peuvent changer le spectre de différents composés en solution.

- Milieu non diffusant : dans un milieu diffusant, une partie de l'intensité incidente est diffusée latéralement et échappe à la mesure.

Pour des mesures précises, il convient donc de n'utiliser que des solutions transparentes.

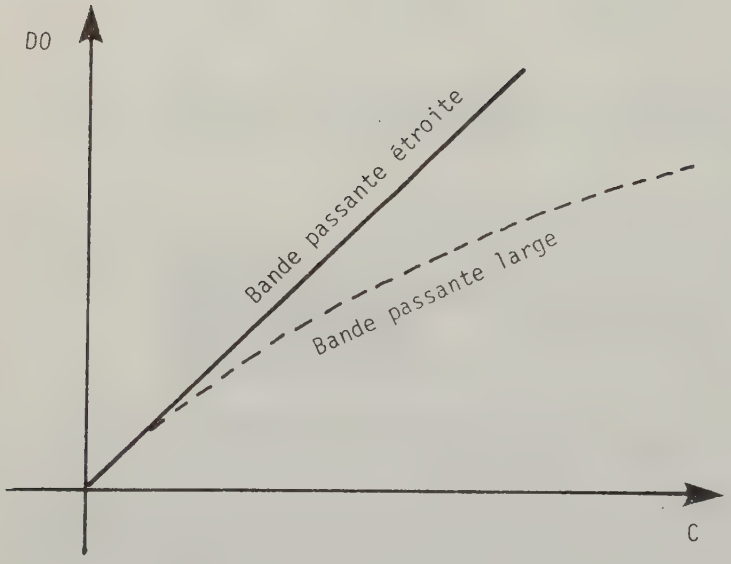


Figure n° 4 - Variation DO : f(C)
en fonction du monochromatisme

I-3 APPLICATIONS PRATIQUES

Les conditions précédentes sont, en pratique, faciles à respecter. Il suffit de disposer d'un bon matériel possédant un monochromatisme aussi strict que possible.
Quant aux conditions affectant les caractéristiques des solutions, elles sont remplies dans les techniques proposées par les ouvrages de chimie clinique ou dans celles commercialisées par les grands laboratoires.

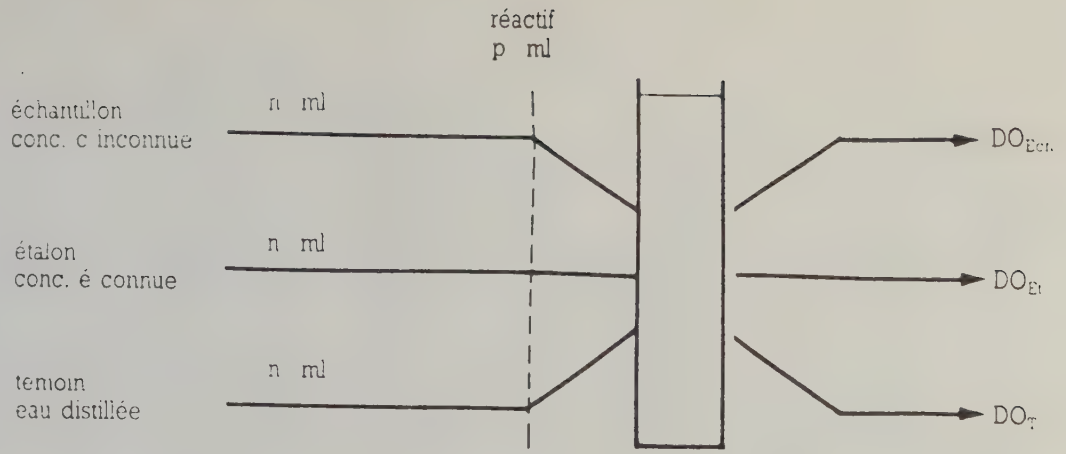
Dans la pratique de l'analyse de chimie clinique, il est rare que l'on ait à effectuer le dosage d'une solution pure d'un seul composé : il s'agit le plus souvent de mélanges réactionnels où réactifs et fluides biologiques sont mêlés.
Dans ce cas, il peut parfois être utile de considérer l'absorption propre des réactifs qui, à la longueur d'onde considérée, peut s'ajouter à celle que l'on veut évaluer : on mesure alors ce que l'on appelle un "Blanc réactif", c'est à dire la DO liée à ces seuls réactifs.

DO mesurée totale = DO réactifs + DO (échantillon / réactifs)

Dans certains cas, plus rares, c'est la coloration du plasma qui interfère le plus et qui doit être prise en compte : c'est en particulier le cas lors d'hyperbilirubinémie avec une coloration jaune intense,d'hyperlipémie avec une importante turbidité du plasma, ou, d'hémolyse avec coloration rosée. On effectue alors un "Blanc Sérum".

Par ailleurs, l'évaluation de la concentration d'une solution après mesure de la densité optique nécessite la connaissance du coefficient k ; la longueur du chemin optique est connue pour chaque type d'appareil.La détermination de k étant souvent très délicate, on évite son calcul en mesurant dans les mêmes conditions la DO obtenue à partir d'une solution étalon de concentration é connue :

DO Etalon = k . é . L



$$c = é.\frac{DO_{Ech} - DO_T}{DO_{Et} - DO_T}$$

figure 5.Calcul de la concentration dans les dosages colorimétriques

Ainsi, en rapprochant les deux remarques précédentes, on voit que la concentration c inconnue dans un échantillon peut être obtenue (figure 5).

Pour conclure, en se fondant sur la loi de Beer-Lambert et en respectant quelques précautions simples, on peut évaluer la concentration d'une solution à condition d'en mesurer la densité optique : cela est réalisé grâce à des appareils spécialisés dont nous allons rapidement envisager les caractéristiques.

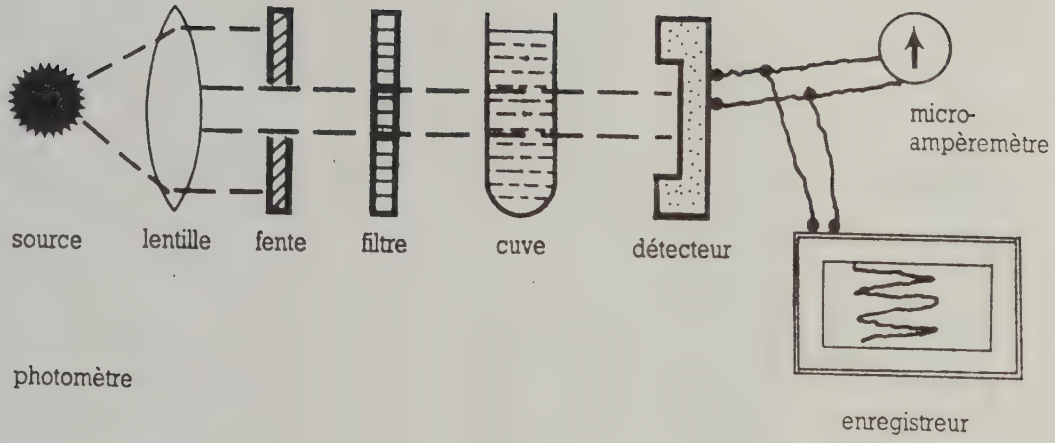


figure 6. Structure générale d'un colorimètre

II- APPAREILLAGE

Après avoir considéré la structure générale d'un photomètre d'absorption moléculaire, nous étudierons brièvement les caractéristiques de chaque élément constitutif (1. 8. 17.18. 19. 26.).

II-1 STRUCTURE GENERALE D'UN PHOTOMETRE

(figure 6) Le rayonnement incident d'intensité Io monochromatique est produit par une source lumineuse orientée par un collimateur en un faisceau dirigé vers un monochromateur selectionnant une bande passante aussi étroite que possible.
La solution se trouve dans le compartiment échantillon, le rayonnement transmis est alors détecté, éventuellement amplifié, et son intensité I est mesurée :
un système de lecture permet alors l'affichage soit de la Densité optique, soit de la transmission, soit encore de la concentration dans les systèmes les plus modernes.

II-2 ELEMENTS CONSTITUTIFS

II-2-1 Source lumineuse

C'est la "lampe". Il peut s'agir :

- de lampes classiques émettant un spectre visible , proche UV, et, infra-rouge par chauffage d'un filament de tungstène.

- de lampes à décharge dans les gaz raréfiés : lampes à halogène ou à deutérium produisant un spectre UV continu, lampes à vapeur de mercure émettant un spectre discontinu intense avec des raies monochromatiques strictes à 334, 365, 405, 436, 492, 546, 578 nm.

La caractéristique essentielle des lampes est leur stabilité. L'intensité de rayonnement fournie diminue avec le temps : il importe donc de les vérifier régulièrement.

II-2-2 Collimateur

La formation du faisceau lumineux se fait à l'aide de miroirs concaves, de lentilles, de fibres optiques, fentes ... La parfaite propreté de ces systèmes est nécessaire pour éviter toute perte d'intensité du rayonnement incident.

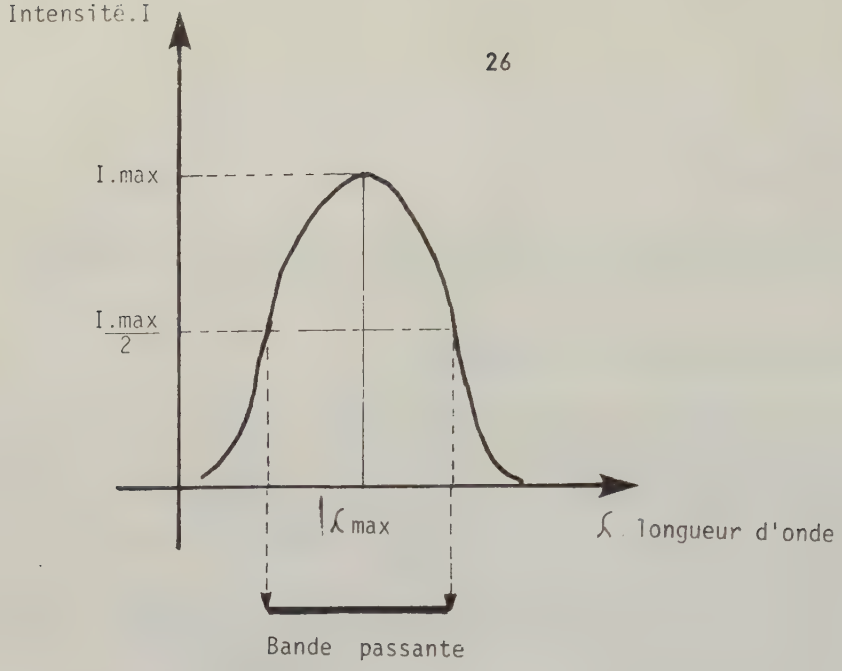


Figure n° 7 - Monochromateur - Spectre de transmission
Caractéristiques -

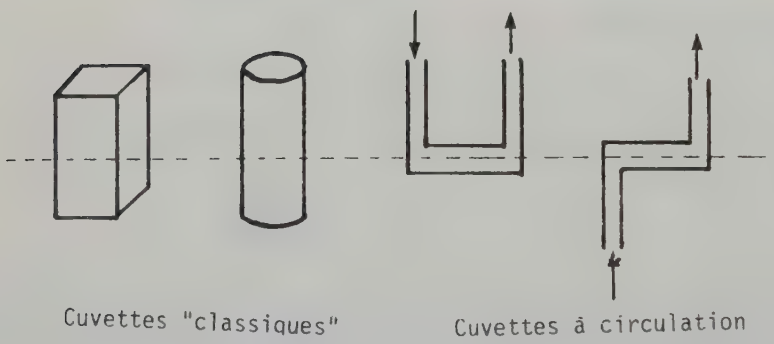


Figure n° 8 - Cuvettes de lecture

II-2-3 Monochromateur

C'est le dispositif dont la fonction est de sélectionner la longueur d'onde voulue.
Il est caractérisé par sa longueur d'onde maximale de transmission et sa bande passante (figure 7).

Il peut s'agir de :

- Filtres interférentiels constitués de l'empilement de lames de verre et de fibres métalliques. A chaque filtre correspond une longueur d'onde donnée avec une bande passante assez large, pouvant atteindre 10 à 20 nm.

- Prismes : ils diffractent la lumière ; leur monochromatisme est plus étroit dans le bleu, le violet, et le proche UV, du fait de l'étalement du spectre.

- Réseaux : constitués d'un bloc métallique finement rayé, ils diffractent la lumière et permettent d'obtenir des bandes passantes étroites (= 1 nm). Leur coût est souvent élevé.

II-2-4 Compartiment échantillon

(figure 8) Les cuves, dans lesquelles l'absorption du rayonnement a lieu, sont de plusieurs types.

- Cuvettes classiques en plastique, verre optique, ou quartz, de section carrée ou circulaire.
Le verre optique absorbant les rayons ultra-violets, il est nécessaire d'utiliser des cuvettes en quartz pour des longueurs d'onde inférieures à 330 nm.
En pratique, l'usage de cuvettes plastiques à usage unique simplifie considérablement les problèmes de lavage et de contamination, mais le coût en est légèrement supérieur.

- Cuvettes à circulation : ces systèmes sont constitués par une tubulure en U ou en baïonnette dans laquelle l'échantillon circule soit par gravité, soit par aspiration à l'aide d'une pompe.
Certains appareils dits "double faisceau" possèdent deux cuvettes juxtaposées, l'une servant de référence pour les "blancs réactifs", par exemple. D'autres gardent en mémoire l'absorption liée aux réactifs et la soustraient automatiquement.

II-2-5 Détecteur-lecteur

Le faisceau transmis est détecté par une cellule photoélectrique et est éventuellemnt amplifié par un photomultiplicateur.
Selon les appareils, la lecture peut se faire sur un galvanomètre, un enregistreur graphique, ou par affichage numérique (sur un cadran ou sur une imprimante) ; cette dernière possiblité est souvent couplée à des calculateurs qui permettent d'obtenir directement les résultats en concentration, en DO ou en transmission.

La mise en oeuvre de ce matériel permet de mesurer l'intensité de coloration lors de réactions de dosage dont les principes généraux sont abordés dans le chapître suivant.

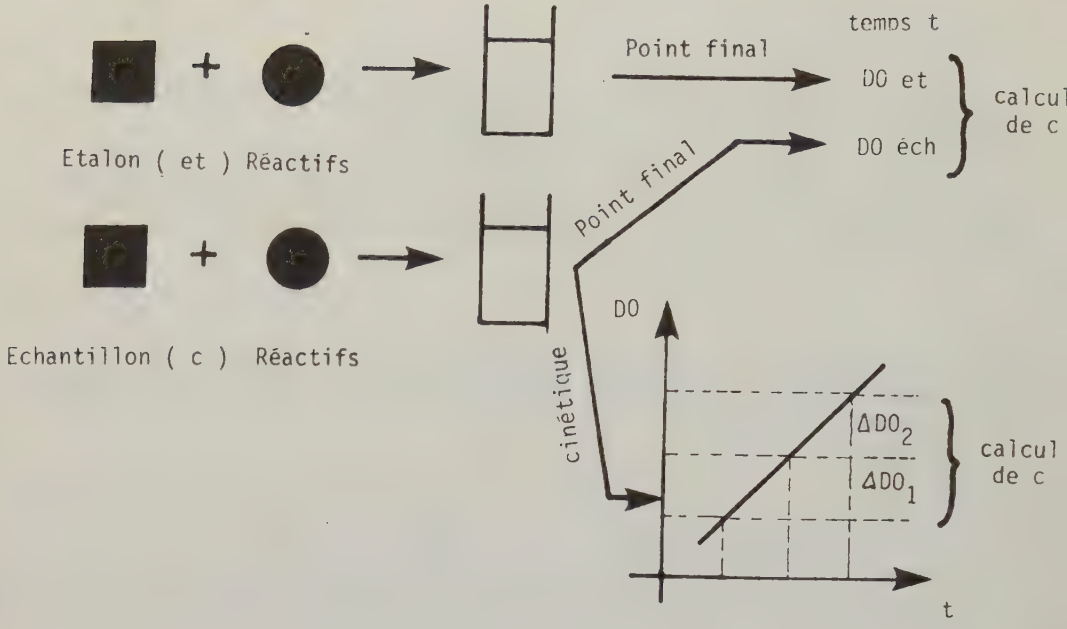


figure n°9. Méthode: Dosage Point final. Cinétique.

III- GENERALITES SUR LES REACTIONS DE DOSAGE

(1 à 6, 17 à 19, 26, 28.)

- Les méthodes de dosage varient selon chaque paramètre. Dans quelques cas assez rares le composé à doser possède une absorption spécifique permettant le dosage ; c'est le cas des protéines qui absorbent les rayons ultra violets à 278 nm.
Cependant pour la plupart des paramètres le principe général est le même : il consiste à faire agir sur le prélèvement biologique un réactif aussi spécifique que possible du paramètre à doser ; à cet égard, la spécificité des enzymes est très précieuse.
De l'interaction (paramètre-réactif) résulte directement ou indirectement une coloration dont l'intensité est mesurée.
Par ailleurs, pour un même paramètre plusieurs méthodes différentes peuvent exister.

- Quelle que soit la méthode retenue, la coloration peut être évaluée de deux manières différentes (figure 9) :

- soit en fin de réaction, ou, après un temps de réaction donné, suffisamment long pour que la réaction soit pratiquement terminée : on parle alors de mesure en point final.

- soit au cours du développement de la réaction ; on mesure alors l'évolution de la coloration en fonction du temps et l'on parle de : mesure cinétique.
Notons que la plupart des mesures cinétiques reposent sur des mesures enzymatiques.

III-1 Dosages en point final

Il ne peut être question d'aborder ici toutes les techniques. Nous nous contenterons de donner deux exemples :

Exemple I : Mesure de la concentration d'urée plasmatique ou sérique à la diacétyle-monoxime.

urée + diacétyle-monoxime ⟶ coloration rouge proportionnelle à la concentration d'urée.

Après incubation pendant 15 minutes à 95°C l'intensité de la coloration est évaluée à 540 nm et comparée à celle obtenue dans les mêmes conditions pour une solution étalon.

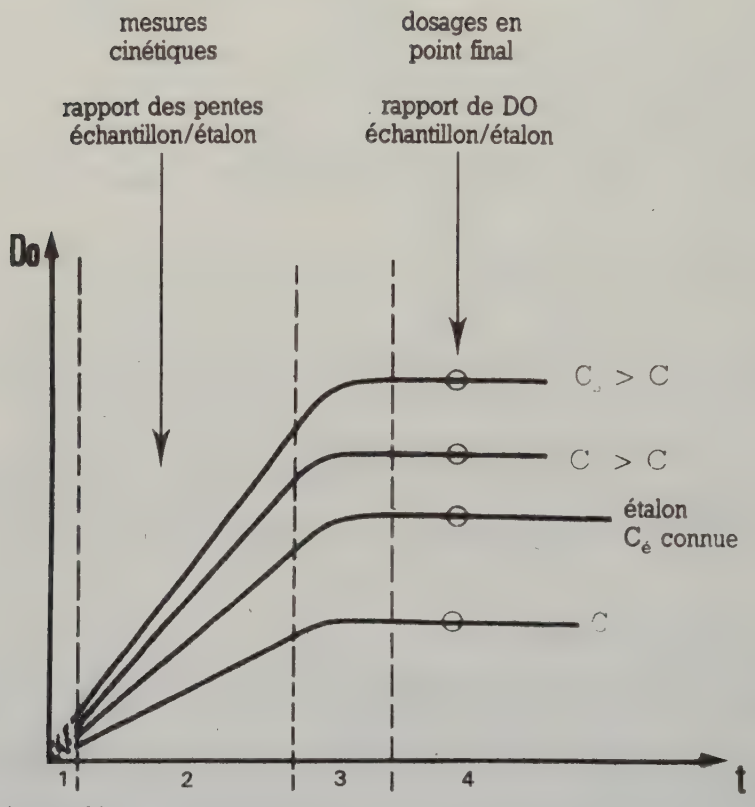


figure 10

phases de la réaction :
1. phase non linéaire de début de réaction,
2. phase linéaire,
3. phase non linéaire de fin de réaction,
4. équilibre de fin de réaction.

Exemple II : Mesure de la concentration de glucose sérique ou plasmatique par la glucose deshydrogénase (GDH).

L'oxydation du glucose en gluconolactone se fait parallèlement à la réduction du NAD^+ en $NADH,H^+$ et la quantité de NADH produite est proportionnelle à la concentration en glucose. Après incubation en milieu tamponné à 37°C, l'absorption du NADH est mesurée à 340 nm.

III-2 Dosages cinétiques

- Ils sont principalement enzymatiques mais peuvent aussi résulter de la seule interaction de composés chimiques. Ils ne sont possibles que dans la mesure où l'évolution de la densité optique est linéaire en fonction du temps. Les dosages enzymatiques ou non dépendent étroitement :

- de la température : on admet en règle générale qu'une variation de 0,1°C de la température entraine 1% d'erreur. Il est donc nécessaire que la cuvette de mesure soit soumise à une thermostatisation très efficace et que les réactifs soient préincubés à la température de réaction.

- du pH : Le pH modifie l'activité des enzymes ; cela implique que les réactions doivent avoir lieu dans des solutions tamponnées.

- du temps de réaction : en général dans les conditions opératoires des manuels de chimie clinique ou celles de coffrets de réactifs des grands fabricants, après une très brève phase d'équilibration initiale, l'évolution de la DO est linéaire en fonction du temps, pendant une période plus ou moins longue, puis elle est moins rapide : c'est cette phase linéaire qui permet le calcul de la concentration, puisque la variation de DO par unité de temps est proportionnelle à la concentration du paramètre à doser (figure 10).

- L'évolution de la DO en fonction du temps peut être mesurée :

- soit par enregistrement graphique continu ; cela permet de vérifier la linéarité de la cinétique mais l'interprétation de la courbe peut parfois diminuer la précision.

- soit en mesurant la DO à des intervalles de temps réguliers parfois nombreux ; cela est classiquement réalisé dans les appareils modernes où un calculateur établit la linéarité de la cinétique et le ΔDO par unité de temps.

FIABILITE	précision	s'apprécie par la reproductibilité : N mesures dans des conditions identiques donnent N resultats identiques.
	détectabilité	plus petite valeur détectable
	exactitude	qualité de l'accord entre valeur mesurée et valeur vraie
	sensibilité	détection des écarts entre les très basses valeurs
	sélectivité	méthode sur N constituants, pouvant être décomposée en N méthodes independantes évaluant chacun des N composants
	spécificité	obtention d'un signal analytique pour un constituant particulier, à l'exclusion de tout autre constituant présent dans le prélèvement
PRATICABILITE		fonction de la compétence du biologiste, du matériel, du prix de revient consenti
EFFICACITE		déceler les variations physiologiques ou pathologiques

Figure 11 : Critères de qualité de l'analyse biochimique.

Deux exemples illustrent les considérations précédentes :

Exemple III : Mesure de la concentration de la créatinine plasmatique ou sérique par la méthode de Jaffé en cinétique.

Créatinine + Soude + Acide picrique ⟶ Coloration jaune orangée

A 30°C pendant environ 1 à 2 minutes et pour des concentrations de créatinine $\leqslant$ 70mg/l, le Δ DO à 500 nm par unité de temps est proportionnel à la concentration de créatinine.

Exemple IV : Mesure de la concentration d'activité catalytique des phosphatases alcalines sériques par la méthode recommandée SFBC.

$$\text{p.nitro phényl phosphate} + H_2O \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{P.A.L.}} \text{p.nitro phenol} + \text{phosphate}$$

A 30°C, en présence de Mg++, les P.A.L. catalysent l'hydrolyse du PNPP en PNP et phosphate ; la quantité de PNP libérée par unité de temps est proportionnelle à la concentration d'activité catalytique des P.A.L. et est évaluée à 405 nm par le Δ DO en fonction du temps.

III-3 Eléments de choix d'une méthode de dosage

- Les méthodes cinétiques sont principalement des méthodes enzymatiques ; elles sont souvent coûteuses et nécessitent un appareillage plus onéreux. Par contre elles sont, en général, plus sélectives, plus précises, et plus rapides.
Toutefois certaines méthodes en point final peuvent être rapides, précises et d'autres coûteuses.

- Le choix d'une méthode est alors souvent très difficile. Il dépend d'abord des possibilités de l'appareillage. Par la suite, on pourra s'entourer des conseils des spécialistes tels que biologistes des laboratoires d'analyses médicales, des hopitaux, des laboratoires départementaux, des écoles vétérinaires, de la Société Française de Biologie Clinique.

- Lors du choix d'une méthode il convient de tenir compte d'un certain nombre de critères (figure 11) :

- SPECIFICITE : plus une méthode est spécifique du paramètre à doser, meilleure elle est au plan théorique. Encore faut-il qu'elle reste aisémment réalisable et d'un coût abordable dans la pratique.

Cette spécificité doit surtout être recherchée lorsqu'il en résulte une grande amélioration des possibilités diagnostiques.

Par exemple, l'ancien dosage du glucose qui mettait en jeu la réduction de la liqueur de Fehling rendait compte de tous les réducteurs du sérum ; une première amélioration a été apportée par les dosages à l'o-toluidine spécifique des aldoses ; enfin, les méthodes enzymatiques à la glucose deshydrogénase ou à l'hexokinase sont encore plus spécifiques.

- L'EXACTITUDE : La méthode choisie doit permettre d'approcher d'aussi près que possible la valeur vraie de la concentration du paramètre à mesurer. Ce critère peut être évalué avec des sérums de contrôle de valeur connue.

- LA LINEARITE : C'est la gamme de concentration dans laquelle la loi de Beer-Lambert reste valable ; au-delà les résultats sont obtenus par défaut et il faut procéder à des dilutions ; en deça, les résultats sont inexacts.

- LA PRATICABILITE : C'est l'aisance avec laquelle une méthode est réalisable. Cette notion est variable en fonction de l'appareil utilisé et aussi des compétences du manipulateur.

Nous avons vu qu'il existe une grande diversité potentielle de matériels qui sont eux-mêmes déterminant dans le choix des réactifs. Nous nous proposons dès lors d'étudier les différents modèles proposés sur le marché ainsi que leur équipement complémentaire.

DEUXIEME PARTIE

L'EQUIPEMENT

I - Le colorimètre

II - Le matériel accessoire

III- Les réactifs

I- LE COLORIMETRE

C'est la partie centrale de l'équipement.

Nous envisagerons en premier lieu les différents types de matériels existant, puis nous exposerons quelques éléments déterminants dans le choix de ces appareils.

I-1 Types de matériel

- Rappelons que, suivant les caractéristiques des matériels, on distingue :

  - des photomètres qui ne permettent d'obtenir qu'un nombre limité de longueur d'onde.

  - des spectrophotomètres qui peuvent donner une gamme de longueurs d'onde d'une manière continue.

Les uns comme les autres, selon la source lumineuse, peuvent fonctionner soit dans le "visible" uniquement, soit dans " l'UV" et le "visible", ils peuvent également être ou ne pas être équipés d'un porte-cuvette thermostaté.

- Selon la conception des appareils, on peut schématiquement faire la différence entre :

  - des systèmes"intégrés" pour lesquels le fabricant a conçu un photomètre et une gamme de réactifs ainsi que du matériel accessoire faisant un"tout".

  - des systèmes classiques associant un photomètre ou spectrophotomètre quelconque à des réactifs et un matériel accessoire variable.

Chacun des deux systèmes présente les inconvénients de ses avantages :

- les systèmes intégrés sont, en général, très simples à manipuler grâce à des réactifs en tubes unitaires et les résultats sont obtenus rapidement ; par contre, ils sont figés dans leur évolution et les techniques de dosages proposées sont exclusivement celles du fabricant et peuvent parfois être désuètes ou le devenir.

Systèmes « intégrés » ; caractéristiques des photomètres ; réactifs dissociés.

PHOTOMÈTRE				RÉACTIFS	
Accustat	filtres	37/95	spéciales	concentration module spécif.	6 000
Unimeter 300	filtres	37	spéciales	concentration carte	10 300
Unimeter 2000	filtres	—	spéciales	DO-concentration digital	23 700
Lange LP1*	filtres	—	spéciales + cuvettes 1×1	DO-concentration digital	10 900
Lange LP6*	filtres	—	spéciales + cuvettes 1×1	DO-concentration digital	29 500
Lange LP6a*	filtres	—	spéciales + cuvettes 1×1	DO-concentration digital	56 700
Compur M 1000	filtres	—	spéciales	échelle graduée	3 245
Compur M 1001	filtres	—	spéciales	échelle graduée	3 364
Compur M 2000	filtres	bain-marie	spéciales	DO-concentration digital	20 500

■ Analyse réalisable grâce à des réactifs d'une autre marque.
systèmes

figure 12. Systèmes intégrés : caractéristiques. Réactifs associés.

- Les systèmes classiques posent davantage de problèmes de choix et sont parfois plus délicats à utiliser; inversement, ils sont évolutifs et peuvent exploiter les techniques de dosages proposées par tous les fabricants.

Par ailleurs, il existe sur le marché un système "intégré" qui n'est pas un colorimètre mais qui mesure l'intensité de coloration d'une bandelette réactive par réflection de la lumière; ce réflectomètre (Seralyzer, Ames) (10) permet à l'heure actuelle le dosage du glucose, de l'urée, de la créatinine, des urates, de CPK, de LDH, de la bilirubine totale et du cholestérol total. Les dosages des deux transaminases TGO et TGP ainsi que celui du potassium sont annoncés dans un proche avenir.

I-1-2 Caractéristiques des systèmes intégrés

Les caractéristiques des systèmes intégrés actuellement commercialisés sont données dans la figure n° 12 (9 à 11, 13 à 16, 20 à 22).

Ce sont des appareils d'encombrement modeste qui se situent dans la gamme moyenne des colorimètres. Il s'agit le plus souvent de photomètres à filtres munis d'une lampe à halogène ou à mercure.
Le porte-cuve manuel peut accepter soit les tubes unitaires prévus par le fabricant, soit différents tubes commercialisés par les laboratoires (cuves rondes, cuves carrées 1x1, micro-cuves).
La lecture des résultats s'effectue soit en DO ou en concentration sur une échelle graduée avec éventuellement un système de cartes adaptées à chaque analyse, soit par affichage digital avec ou non recours à un calculateur.
Certains peuvent être munis d'un porte-cuve thermostaté et de longueur d'onde proche UV (340 nm).
Notons que certains d'entre eux peuvent s'utiliser également avec les réactifs d'autres fabricants, ce qui n'est pas là un moindre intérêt (ils sont signalés par un astérisque).
De façon générale, ces colorimètres peuvent effectuer la plupart des analyses courantes et conviennent parfaitement dans le cadre d'une clientèle moyenne.

I-1-3 Caratéristiques des systèmes classiques (11, 13, 15)

Il est à peu près impossible de faire l'inventaire des différents spectrophotomètres disponibles sur le marché.
Toutes les grandes marques (Beckman, Baush et Lomb, Kontron ...) commercialisent des appareils variés aux performances tout aussi variées.
A la base, nous trouvons des appareils type photomètre ou spectrophotomètre à spectre "visible" ou "UV-visible" pour lesquels la manipulation des cuves est manuelle.

La lecture s'effectue de plus en plus par affichage numérique en DO ou en concentration. Une première amélioration consiste à coupler une cuve à circulation limitant les manipulations. Le compartiment de lecture peut être thermostaté; pour les dosages cinétiques, très couramment employés, cette dernière caractéristique ainsi que la présence de longueur d'onde proche ultra-violet (340 nm) sont indispensables.
Dans la pratique, un photomètre UV-visible avec cuve à circulation thermostatée constitue déjà un excellent équipement pour une clientèle moyenne. Au-delà, les capacités peuvent être accrues par des calculateurs inscrivant en mémoire les caractéristiques des méthodes (Blanc-réactif, étalon), des passeurs d'échantillon, des imprimantes etc... jusqu'aux automates intégraux dont le coût et la technique dépassent largement le cadre de la plupart des clientèles vétérinaires.

I-2 Eléments de choix d'un colorimètre

Différents éléments peuvent servir au choix d'un colorimètre.
En premier lieu, il faut tenir compte des autres possibilités de dosage biochimique et déterminer si l'acquisition d'un tel appareil est réellement justifiée.
Par la suite, le praticien doit définir les objectifs et les moyens dont il dispose et choisir un appareil en fonction de ses qualités, de ses performances et de son coût.

I-2-1 Autres possibilités de dosage biochimique

Il existe de nombreuses techniques de dosage biochimique. Celles-ci font l'objet d'une revue récente (10).

Parmi les plus employées, on distingue :

- des bandelettes sanguines : à lecture directe, type "Merckognost", pour l'urée.

- des réflectomètres : leur intérêt et leurs multiples possibilités ont été mentionnés plus haut.

- des bandelettes et tests urinaires : dont la simplicité d'utilisation et le faible prix de revient en font des auxiliaires très appréciés.

TYPES DE MATERIEL / FACTEURS PERSONNELS, OBJECTIFS, MOYENS.		PHOTOMETRES			AUTRES SYSTEMES
		INTEGRES	CLASSIQUES Cuve thermostatée proche UV	AUTOMATIQUES	BANDELETTES Urée
NOMBRE, VARIETES, ANALYSES.	+				●
	++	●	●		O
	+++		O	●	O
TEMPS DISPONIBLES	+		O		●
	++	●	●	●	O
COMPETENCE TECHNIQUE	+	O	O		●
	++		●	●	O
INVESTISSEMENT	+				●
	++	●	●		O
	+++		O	●	O

FIGURE 13 — Facteurs de choix d'un colorimètre.

\+ = faible
++ = moyen
+++ = important

● = usage recommandé
O = usage possible

D'autre part, un certain nombre de laboratoires spécialisés (Direction des Services Vétérinaires, Hopitaux, Ecoles Vétérinaires, Laboratoires Médicaux...) peuvent effectuer dans des délais assez brefs et en utilisant des techniques éprouvées tous les types d'analyses désirés.

I-2-2 Objectifs et moyens du praticien

Les objectifs concernent le nombre et la variété d'analyses à effectuer. On pourra, par exemple, utiliser systématiquement la colorimétrie dans tous les domaines de la médecine vétérinaire (médecine, chirurgie...) ou simplement l'appliquer à quelques cas, en vue de préciser tel ou tel diagnostic.
Dans cette dernière hypothèse, nous verrons que l'achat d'un tel appareil n'est pas toujours justifié.

Les moyens à évaluer sont d'ordre technique et financier.
Il faut, en effet, prendre en compte la compétence technique du praticien et le temps libre dont il dispose, ainsi que le niveau d'investissement désiré.

Ces critères, définis par le praticien lui-même, permettent d'établir une première sélection parmi les différents appareils proposés.

I-2-3 Critères de choix liés au matériel

Certains critères simples permettent d'évaluer les qualités des appareils.

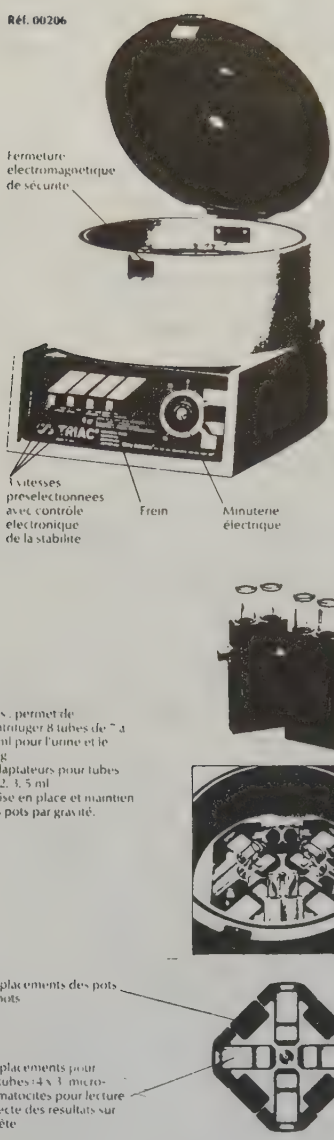
On retiendra essentiellement :

- la praticabilité. C'est la facilité avec laquelle on peut utiliser un appareil. Les colorimètres les plus pratiques sont par définition les systèmes intégrés. Pour les systèmes classiques, ce critère varie en fonction de leurs perfectionnements techniques (micro-calculateur, passeur d'échantillon automatique...).

- les performances. Celles-ci varient considérablement selon les appareils et doivent être adaptées aux objectifs fixés.

- le coût. Celui-ci détaillé à la fin de notre étude doit de même être en rapport avec les possibilités du praticien.

Ces différents éléments ont été regroupés dans la figure 13 de manière à faire apparaître quel type de matériel pouvait convenir le mieux à une situation donnée.



Centrifugeuse mixte de paillasse
(Document Becton Dickinson)

Mini centrifugeuse
(Document Compur Electronic)

Figure 14 - Centrifugeuses.

Cependant, ce tableau n'est pas exhaustif et ne tient pas compte des motivations personnelles.
Aussi nous avons volontairement écarté les petits colorimètres de conception trop simple à notre goût. Ceux-ci peuvent toutefois convenir à une petite clientèle aux moyens limités.

II- LE MATERIEL ACCESSOIRE

Ce matériel n'est en principe pas indispensable dans les systèmes intégrés sauf en ce qui concerne une centrifugeuse nécessaire à la préparation des sérums ou plasmas.
Dans le cas d'un équipement classique, cette centrifugeuse est également indispensable. En outre, des bains-marie secs ou classiques, et des pipettes ou micro-pipettes automatiques sont nécessaires.

II-1 Les centrifugeuses

On distingue plusieurs types de centrifugeuses (figure 14) :

- des centrifugeuses de paillasse adaptées :
- soit à la mesure de micro-hematocrite.
- soit à la centrifugation de tubes de formes et de capacités variées.

Pour effectuer un micro-hematocrite, il faut une accélération de l'ordre de 10.000g, alors que 2.500g à 4.000g suffisent pour centrifuger des tubes.

- des centrifugeuses de paillasse mixtes, permettant à la fois les deux manipulations, soit à une seule vitesse, soit à deux vitesses différentes. Ces dernières sont d'un coût légèrement plus élevé que les précédentes mais évitent l'achat de deux appareils ; cependant pour certaines, la vitesse de rotation est faible pour la mesure d'hematocrite, ou bien, il faut changer de rotor pour passer d'un type de centifugation à l'autre, ce qui diminue l'intérêt.
Par ailleurs, il existe une petite centrifugeuse portable alimentée par piles, qui permet de faire des mesures satisfaisantes de l'hematocrite sur un prélèvement faible de l'ordre de 25 µl (Compur-Electronic). Toutefois, elle ne se prête pas à la préparation de plasma ou de sérum, si ce n'est à leur récupération à l'aide de microcapillaires adaptés aux systèmes intégrés portables du même fabricant.

Le coût moyen d'une centrifugeuse simple est de l'ordre de 3.000 F et de près du double (5.000 F) pour une centrifugeuse mixte.

Figure 15 - Pipettes automatiques.

II-2 Les bains-marie

Les bains-marie secs ou classiques sont nécessaires à l'incubation des mélanges réactifs-échantillons. Ils peuvent être intégrés au colorimètre (Accu-Stat) ou assurer la circulation d'eau nécessaire à la thermostation du compartiment échantillon (Compur M2000). Ils peuvent aussi être séparés.

Là encore les marques sont très variées et le coût reste modéré, de l'ordre de 1.500 F à 2.000 F pour un bain-marie de bonne qualité.

II-3 Pipettes et micro-pipettes

Les micro-pipettes automatiques ont avantageusement remplacé les pipettes traditionnelles en verre gradué. Elles peuvent être de différents modèles (figure 15)

- avec des embouts jetables
- avec des tubes capillaires, réservés en général aux petits volumes ($\leqslant 100\ \mu l$).

Les uns comme les autres peuvent être à volume fixe, à plusieurs volumes ou à volume variable en continu.

Le coût de ces micro-pipettes varie de 500 F environ pour les plus simples à 1.500 F pour les modèles les plus élaborés.

D'autre part nous verrons dans le chapître "contrôle de qualité", qu'une attention particulière doit être apportée à leur entretien et à la vérification de l'exactitude du volume délivré : en effet, la moindre erreur de volume se répercute sur l'ensemble du dosage. Cela a une importance encore plus grande pour la mesure du volume de l'échantillon : ce dernier est souvent très faible ($\leqslant 100\ \mu l$) et l'erreur relative est d'autant plus grande.

DOSAGE UREE	SPECIFICITE	LINEARITE MAXIMALE	PRATICABILITE
Diacétyl monoxime	+	2,15 g/l	+
Uréase	+++	1,25 g/l	+++

Figure 16. Variations des critères de qualité des méthodes de dosage .

III- LES REACTIFS

- Pour les réactifs, aucun problème ne se pose avec les systèmes intégrés puisque l'utilisateur doit nécessairement se limiter à ceux qui sont "couplés" au photomètre.

- Pour le reste, le choix des réactifs et leur présentation dépend de plusieurs facteurs :

- L'équipement et ses caractéristiques : il faut que les réactifs choisis, c'est à dire la technique appliquée, soit réalisable sur l'appareil que l'on possède. Par exemple, ne pas disposer d'une cuve thermostatée et d'une longueur d'onde proche UV empêche pratiquement toute mesure cinétique.

- Le nombre d'analyses réalisées : la plupart des réactifs sont présentés soit en conditionnement unitaire, c'est à dire pour un seul dosage, notamment pour les systèmes intégrés; soit en semi-vrac pour 5 à 10 dosages ; soit en vrac pour effectuer plusieurs dizaines d'analyses.

Les premiers sont plus coûteux mais d'un emploi plus rapide ; les seconds se prêtent aux dosages en série mais souvent le réactif reconstitué se périme relativement rapidement (24 à 48 H.).

Le vrac, enfin, ne convient qu'aux grandes unités.

- les qualités de la méthode : Ces qualités ont été envisagées plus haut (cf. choix des réactifs). Retenons qu'elles peuvent varier considérablement d'une méthode à l'autre et qu'elles ne sont pas toujours complémentaires (figure 16).
Dans cet exemple, nous voyons que l'excellente praticabilité de la méthode à l'uréase compense sa faible linéarité.

- Une fois le choix de la technique opéré, les réactifs peuvent être trouvés dans les catalogues des principaux fabricants : Boehringer,Roche, Dow, Merck, Bio-Merieux, Biolyon, Sigma ...
On y trouve des réactifs nécessaires au dosage de tous les paramètres sanguins classiquement utilisés en médecine vétérinaire ; les exceptions les plus marquantes sont : sodium, potassium, zinc.
Dans la mesure où l'on est bien équipé, où l'on dispose de suffisamment de temps et d'un débit suffisant, il existe aussi des trousses de réactifs permettant des dosages hormonaux par des méthodes de compétition ; dans ce dernier cas il semble cependant assez prudent de s'adresser à des laboratoires spécialisés.

Nous avons vu qu'il existait une gamme variée d'appareils et de réactifs qui couvrent l'ensemble des besoins du praticien. Nous nous proposons maintenant d'étudier les différents aspects de leur exploitation.

TROISIEME PARTIE

EXPLOITATION D'UN COLORIMETRE

I - ASPECTS TECHNIQUES

Rappel

I-1 Variations biologiques.
I-1-1 Variations intra-individuelles.
I-1-2 Variations inter-individuelles.

I-2 Variations analytiques.
I-2-1 Variations pre-instrumentales:
- Collecte
- Traitement
- Identification et stockage

I-2-2 Variations instrumentales:
- Protocole spécifique
- Protocole général:
  * Préparation de l'appareil
  * Calibration
  * Dosage proprement dit.

I-3 Maîtrise de la variation : contrôle de qualité.

II - ASPECTS ECONOMIQUES.

II-1 Coût des appareils et accessoires.

II-2 Coût des réactifs.

II-3 Frais d'exploitation et rentabilité.

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

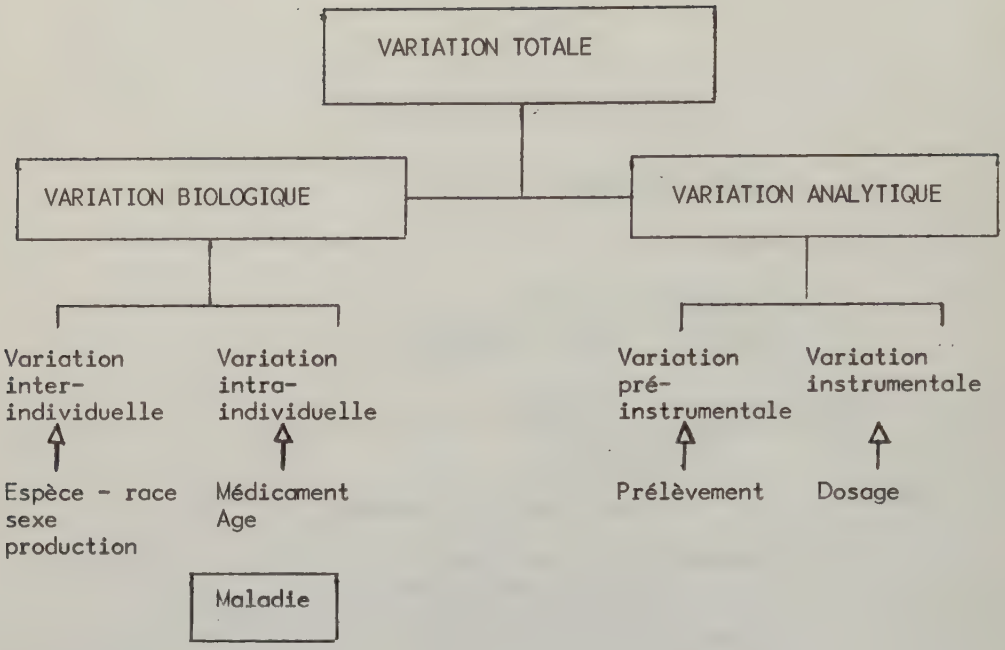


Figure 17 . Facteurs de variation des analyses biochimiques.

I - ASPECTS TECHNIQUES

Rappel

Les étapes de l'analyse biochimique sont soumises à de nombreux facteurs de variations (10, 27).
C'est la connaissance et la maîtrise de ces facteurs qui assurent la qualité d'un dosage colorimétrique (figure 17).
Nous envisagerons donc successivement chacun d'eux.

I-1 Variations biologiques.

I-1-1 Variations intra-individuelles.

Les variations intra-individuelles contiennent toute une série de variations physiologiques (médicament, âge, prise de repas...), qu'il faut connaître pour mettre en évidence la seule variation pathologique que l'on recherche.
Les prises de repas, par exemple, ont une influence sensible sur la glycémie et la calcémie.
C'est pourquoi les valeurs physiologiques de références sont données pour des organismes à jeun (hormis pour les ruminants).

I-1-2 Variations inter-individuelles.

Les variations inter-individuelles recouvrent l'hétérogénéité des populations (espèce, race, sexe, production...).
L'interprétation des résultats nécessite donc de considérer une population aussi large que possible vis à vis de l'objectif visé; par exemple : vaches laitières à haute production en élevage intensif, pour des troubles du post-partum.

I-2 Variations analytiques.

I-2-1 Variations pré-instrumentales.

La variation pré-instrumentale tient essentiellement aux conditions de prélèvement.

	héparinate lithium	Wintrobe	fluorure oxalate	silicone	E D T A
urée	●	○		●	○
glucose	●		●	●	○
sodium	●			●	○
potassium	●			●	
chlore	●	○		●	
protéines		○		●	
cholestérol	○	○		●	
bilirubine		○		●	
acide urique	○		○	●	○
albumine	○			●	○
hémoglobine	●	●			●
hématocrite	●	●			●
numér. glob.	●	●			●
créatinine	○	●		●	●

Figure 18. Utilisation des tubes de prélèvement de sang :
● usage recommandé
○ usage possible.

Température / Présentation	Température ambiante	+ 4°C	- 16°C
Sang total	30 à 60 mn.	4 heures	
Plasma - Sérum après centrifugation	4 heures	24 à 48 H.	Plus de 48 H.

Figure 19 . Délais de conservation des échantillons.

Ceux-ci se déroulent en trois étapes :

- La collecte : elle peut s'effectuer, après ponction, par recueil direct dans un tube ou par aspiration au moyen d'une seringue ou de tubes à vide (types vacutainers) de volume variables.
Quelques précautions doivent être respectées pour obtenir un bon prélèvement :
. Eviter le phénomène de garrot (accumulation de substances dissoutes dans le sang), en relâchant celui-ci au cours du remplissage.
. Limiter les phénomènes d'hémolyse en n'utilisant que de la verrerie propre et sèche exempte de toute trace de détergent, et en évitant toute manipulation brutale du prélèvement (transvasement, mélange de l'anticoagulant).
D'autre part, les tubes à vide,type vacutainers, doivent être munis d'aiguilles suffisamment grosses.

- Le traitement : la plupart des prélèvements nécessite l'emploi d'anticoagulants. Ceux-ci sont en général mentionnés dans les notices des fabricants. Cependant certaines interférences peuvent fausser les résultats. Une attention particulière devra donc être apportée à leur choix (figure 18).

- Identification et stockage : pour éviter toute confusion, les prélèvements doivent être clairement identifiés au moyen d'une étiquette mentionnant le nom et l'adresse du client ainsi que les analyses à effectuer.
Le stockage peut être nécessaire si on ne dispose pas de personnel ou de temps suffisant pour effectuer les analyses immédiatement.
Le tableau (figure 19) nous donne les délais de conservation de l'ensemble des paramètres sanguins. Ces délais peuvent toutefois être allongés pour certains constituants.

I-2-2 Variations instrumentales.

Les variations instrumentales tiennent au matériel, aux réactifs, et aux manipulations.
Les qualités du matériel et des réactifs ont été abordées dans les chapîtres précédents.
Les manipulations quant à elles doivent faire l'objet d'une grande attention. Celles-ci sont, en effet à l'origine d'un certain nombre d'erreurs.

On distingue deux types de protocole :

- Un protocole spécifique à chaque méthode. Il concerne la durée et la température d'incubation, les volumes de réactifs et d'échantillons

utilisés, la longueur d'onde choisie etc...
Ces caractéristiques sont largement détaillées dans les "modes d'emploi" fournis par les fabricants de réactifs. Il convient de les appliquer strictement tout au long de l'analyse.

- Un protocole général . Le protocole général commun à tous les dosages comporte trois étapes schématisées dans le tableau ci-dessous (figure 20):

A	Préparation de l'appareil	Mise à zéro Blanc réactif Blanc sérum
B	Calibration	Par une solution étalon Par introduction d'un facteur
C	Dosage	En point final En cinétique

Figure 20. Protocole général de dosage.

* Préparation de l'appareil :

Après le branchement de l'appareil et des incubateurs, on attend la mise sous tension de la lampe et on sélectionne la longueur d'onde voulue. On procède alors :

- à la mise à zéro : elle s'effectue à l'aide d'un tube rempli d'eau distillée ; le tube est placé dans le compartiment échantillon et l'aiguille ou le cadran de lecture est placé sur le zéro. On obtient ainsi le zéro de l'appareil.
Pour certains colorimètres, cette opération est automatique.

- au blanc réactif et blanc sérum : ces opérations envisagées plus haut sont appliquées chaque fois que la méthode ou le prélèvement l'exigent.

* Calibration de l'appareil :

La calibration a pour but d'étalonner l'appareil et de supprimer le coefficient k.
Elle peut s'effectuer :

- soit au moyen d'une solution étalon de concentration connue C Etalon, dont on mesure la densité optique DO Etalon.

- soit en introduisant dans l'appareil un facteur de calibration déterminé par le fabricant de réactifs et qui est pris en compte pour le calcul de la concentration.

* Dosage proprement dit :

Après avoir suivi scrupuleusement le mode d'emploi fourni par le fabricant on introduit la cuve échantillon/réactifs dans le compartiment de lecture. Selon la méthode choisie, le dosage s'effectue en point final ou en cinétique. Le calcul final peut être manuel ou automatique selon l'appareil utilisé.

- Calcul manuel :

- En point final : la concentration C de l'échantillon est obtenue par la formule envisagée précédemment.

- En cinétique : on calcule la moyenne des variations de densité optique pour un temps donné :

$$\Delta DO = \frac{\Delta DO1 + \Delta DO2 + \ldots + \Delta DO}{n.}$$

La concentration est obtenue à l'aide de tables de correspondances fournies par le fabricant.

- Calcul automatique :

Les appareils munis de calculateurs donnent directement les valeurs en concentration , en densité optique ou en transmission.

L'exactitude des résultats ainsi obtenus peut être vérifiée par divers procédés qui constituent le "contrôle de qualité".

I-3 Maîtrise de la variation : contrôle de qualité.

Le contrôle de qualité a pour but de tester et de surveiller la valeur des techniques et le bon fonctionnement des appareils. Pour cela les critères de qualité ont été définis par les experts de l'IUPAC et de l'IFCC (23 à 25, 29 à 30). Nous avons mentionnés ceux-ci figure 11.
Il convient ensuite de surveiller cette qualité pour la maintenir constante.

Pour vérifier la précision et l'exactitude, on utilisera un ou plusieurs "sérum de contrôle" contenant une concentration définie de la substance à doser. De tels sérums sont livrés par de nombreux fabricants (Bio-Mérieux, Boehringer, Dow, Roche ...).
Si les valeurs mesurées ne correspondent pas aux valeurs données il faudra rechercher la source d'erreur.
Nous proposons ici un schéma de recherche simple des principales causes d'erreur qui peuvent intervenir dans la pratique courante.

I-3-1 Contrôle des manipulations.

En cas de non-concordance on devra suspecter l'une des défections suivantes :

- Défaut de propreté de la verrerie (traces de détergents, poussières, rayures de cuves).

- Imprécision dans la délivrance du réactif ou de l'échantillon.

- Péremption des réactifs.

- Altération du prélèvement (anticoagulant inadéquat, interférences)

- Erreurs de manipulation (température, mesure du temps ...).

Si aucune de ces défections n'est relevée, il convient de s'intéresser aux appareils eux-mêmes.

I-3-2 Contrôle de colorimètre.

- Défaut de la lampe (usure, diminution d'intensité).

- Défaut des filtres (mauvaise sélection de longueur d'onde).

- Défaut du système de mesure (diminution de sensiblité).

I-3-3 Contrôle des appareils complémentaires.

- Micropipettes. Les volumes dlivrés par les micropipettes doivent être controlés régulièrement.
Les quantités infimes , en particulier pour les échantillons (10 à 15µl), nécessitent en effet une très grande exactitude et précision dans la mesure des volumes délivrés ; la moindre erreur ayant une répercussion d'autant plus grande dans les résultats.
Pour cela on utilise au choix :
- soit une balance de précision.
- soit des microtubes capillaires étalon délivrés dans le commerce.

- Bain-marie. Le contrôle des températures s'effectue au moyen d'un bon thermomètre.

Pour garantir la qualité des dosages, l'ensemble de ces vérifications doit être effectué périodiquement, même en l'absence de résultats aberrants. D'autre part le prix des différents sérums de contrôle doit être pris en compte dans l'évaluation du coût de la colorimétrie que nous envisageons maintenant.

Type de colorimètre	Dénomination	Prix moyen
Systèmes intégrés	Compur M 1001	5.000 F
	Accu-Stat	6.000 F + modules
	Unimeter 300	10.300 F
	Unimeter 2000	23.700 F
	Compur M 2000	23.000 F
Systèmes classiques	Photomètre simple	10.000 F
	Photomètre proche UV + cuve thermostatée	25.000 F
	Spectrophotomètre	40.000 F
Automates		150.000 F et plus

Figure 22. Coût des colorimètres (tarif 82).

Une centrifugeuse	3.000 F
2 ou 3 micropipettes	1.500 F
Un incubateur	1.500 F
Total	6.000 F

Figure 23. Prix du matériel complémentaire .

II- ASPECTS ECONOMIQUES

Le coût de la colorimétrie peut être évalué en fonction de trois facteurs:

- Le coût des appareils et du matériel accessoire.
- Le coût des réactifs.
- Les frais d'exploitation.

II-1 Coût des appareils et du matériel accessoire.

* Le coût des colorimètres varie considérablement selon les appareils et les fabricants (figure 22).
Dans ce tableau , nous voyons qu'il est possible d'acquérir un bon matériel adapté aux exigences d'une clientèle moyenne pour 25.000 F environ.

* Le coût approximatif des différents appareils complémentaires est représenté figure 23. Cette dépense revient à environ 6.000 F . Ainsi, un ensemble, colorimètre et accessoires, suffisant pour équiper un cabinet vétérinaire classique coûte environ 31.000 F . A cela s'ajoutent le prix des réactifs et les frais de fonctionnement.

II-2 Coût des réactifs.

Le prix des réactifs varie aussi largement en fonction des méthodes et des présentations utilisées (figure 24).
Le vrac apparaît beaucoup moins onéreux que le test unitaire. Il nécessite cependant un roulement d'analyses important.
L'idéal pour une clientèle moyenne semble être la présentation en test unitaire ou semi-vrac.
Si le nombre d'analyses journalières n'est pas suffisant, nous avons vu qu'il était possible de regrouper les manipulations dans un jour de la semaine, afin d'éviter la péremption des réactifs reconstitués.
Notons que cela s'oppose à l'idée de disposer immédiatement des résultats pour une plus grande efficacité.

II-3 Frais d'exploitation et rentabilité.

Les frais d'exploitation concernent les consommables courants et les frais de main-d'oeuvre éventuels.

- Les consommables : on entend par consommables l'ensemble, cuvettes de dosages et embouts de micropipettes, nécessaire aux manipulations.

Dosage	Kit unitaire	Kit ou semi-vrac	Vrac automatique
Méthode à l'o-toluidine	4 F		0,30 F
Méthode à la G.D.H.		0,80 F	

Figure 24. Prix des réactifs 1982. (Exemple dosage glucose-DOW.)

Cuvette plastique	0,40 F
Embout de micropipettes minimum 2	2 x 0,20 F
Total pour un dosage	0,80 F

Figure 25. Prix des consommables.

Ce matériel peut être en verre lavable ou en plastique à usage unique. L'intérêt de ce dernier a déjà été souligné ; il supprime en effet tous les inconvénients dus aux lavages et à l'entretien du matériel mais revient néanmoins un peu plus cher puisqu'il coûte 0,80 F à 1,00 F par dosage (figure 25).

- Main-d'oeuvre : le coût de la main-d'oeuvre varie selon que l'introduction de la colorimétrie dans le cabinet vétérinaire nécessite ou non l'emploi de personnel supplémentaire. Si tel est le cas, les critères retenus pourraient être, par exemple, les tarifs pratiqués par les laboratoires médicaux. Si ces analyses ne nécessitent pas de main-d'oeuvre supplémentaire, seul le coût des réactifs intervient dans le prix de revient,et l'amortissement du matériel peut être assez rapide. (figure 26)

	Bilan métabolique (12) (Glucose, urée, créatinine,bilirubine T.G.O., T.G.P., P.A.L.)
Tarifs laboratoire 1983	190 F environ
Evaluation coût unitaire (pour consommables: x 1,5)	70 F

Figure 26. Rentabilité du matériel colorimétrique.

Nous voyons que si la colorimétrie ne permet pas de réaliser de bénéfices importants, il est possible d'effectuer un certain nombre d'analyses sans perdre d'argent. Le principal attrait réside surtout dans une meilleure efficacité professionnelle fondée sur des critères scientifiques.

CONCLUSION

Nous avons vu que la spectrophotométrie d'absorption moléculaire était régie par la loi de Beer-Lambert, celle-ci démontre que l'absorption d'un rayonnement monochromatique par une solution colorée est proportionnelle à la concentration et à la longueur de solution traversée.

Parmi la grande variété d'appareils proposés sur le marché,les photomètres et spectrophotomètres munis de longueur d'onde visible et proche ultraviolet, et d'un porte-cuve thermostaté conviennent parfaitement aux exigences d'une clientèle classique.

La manipulation de ces appareils doit se faire en respectant strictement certaines règles : la fiabilité des résultats étant assurée par le contrôle de qualité.

Le coût du matériel peut apparaître relativement modique face à l'intérêt et aux possibilités qu'il apporte :meilleure efficacité professionnelle, plus grande rigueur du diagnostic fondé sur des données scientifiques, plus grande satisfaction personnelle pour un exercice plus précis. Ces améliorations du service, très appréciées de la clientèle, ne peuvent que contribuer à l'essor et au perfectionnement des cabinets vétérinaires. La colorimétrie semble donc promise à un grand avenir, dans ce domaine.

VU : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Professeur RICO

VU : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

VU : Le Président de la Thèse

Professeur DOUSTE-BLAZY

VU et PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 26-3-1984
Le Président de l'Université Paul Sabatier

UNIVERSITE PAUL-SABATIER TOULOUSE

Professeur [illegible]

BIBLIOGRAPHIE

1 KAMAUR P.
Appareils et méthodes en biochimie.
1° édition Paris Flammarion, 1975, 205 p.

2 BUSH B. M.
Veterinary laboratory manual.
Unwin Brothers limited.
1° édition, 1975, 447 p.

3 OLIVIER H. R.
Traité de Biologie appliquée. Tome 1.
Methodes et techniques générales d'analyses.
Instrumentations et appareillages.
1° édition. Paris. Maloine 1961. 608 p.

4 CAGNY - CAUBERT M.
Guide pratique des examens complémentaires des animaux de compagnie.
1° édition Paris. New-York : Masson 1982. 128 p.

5 METAIS P. et COLL.
Biochimie clinique 1° volume : Biochimie appliquée.
Lyon. SIMEP. 1977. 221 p.

6 DEVAUX (Guy).
Choix de techniques de Biochimie clinique.
2° édition. Paris : Gauthier-Villars. 1970. 385 p.

7 SODIKOFF (Charles).
Laboratory profiles of small Animal Deseases.
1° édition. Santa Barbara California : American Veterinary.
Publication Inc. 1981. 215 p.

8 RICHTERICH R. COLOMBO J. P.
Clinical chemitry. Theory. Practice, and Interpretation.
John Wiley and Sons. 1981 766 p.

9 MEISSONIER E., JOIN LAMBERT P., DEVISME P.,
Dictionnaire des médicaments vétérinaires 1979.
Maison-Alfort.
Edition Le Point Vétérinaire 1979. 700 p.

10 BAYSSIERE (Jean-Pierre)
S'équiper pour la Biochimie Clinique Vétérinaire.
Thèse med. vet. Toulouse 1983.

11 CHARPENTIER (François)
Utilisation d'un photocolorimètre pour les dosages de routine en clinique vétérinaire.
Thèse med. vet. Créteil. 1970. n° 107.
Paris imp. Copedith. 52 p.

12 PAGES. Castres.
L'examen de laboratoire à la consultation vétérinaire.
Enquête réalisée auprès de 500 vétérinaires.
Castres. 1980.

13 BRAUN J.P., RICO A.G., BENARD P.
Petits colorimètres et trousses de réactifs pour analyses biochimiques rapides.
Congrès internationnal de médecine et chirurgie des animaux de compagnie. Paris. 15, 16, 17 juin 1978.

14 GUILLON B., RICO A.G., BRAUN J.P., BENARD P.
Etude critique d'un colorimètre pour analyses biochimiques rapides: l'Accu-Stat Chimie.
Rev. med. vet. 1978, 127, 83-92.

15 BRAUN J.P., RICO A.G., BENARD P.
Présentation comparée de nouveaux colorimètres pour analyses biochimiques.
Rev. Med. Vet. 1975. 126, 1627-1633.

16 GABRIELLI M.
Accu-Stat Chimie : étude critique des performances du matériel et et des possibilités d'utilisation en service de biologie d'urgence.
1° vol. Laboratoire central de biochimie de la conception.Marseille 1974.

17 HARTMANN (Lucien)
Techniques modernes de laboratoires et explorations fonctionnelles.
Paris. L'expansion scientifique française. 1971. 140 p.

18 BESSUARD J.
Technologie et pratique de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire.
Paris. Beckman Instrument France. 1969. 140 p.

19 STROEBEL H.A.
Les études physiques en chimie.
Etudes systématiques de l'analyse instrumentale.
Paris : Masson et Cie 1962. 635 p.

20 GOGNY - GOUBERT M.
Bandelettes réactives et analyseur sanguin : utilisation en médecine canine et équine. Comparaison avec les techniques classiques de laboratoire.
Thèse Doc. Vet. Alfort. 1974.

21 GUELFI J.F., BRAUN J.P., RICO A.G., BENARD P.
Hématologie canine. Etude critique de petits appareils conçus pour l'exploration rapide des paramètres érythrocytaires.
Rev. Med. Vet. 1979. 155. 895-898.

22 DUCRET J., RICO A.G., BRAUN J.P., BENARD P.
Etude critique d'un colorimètre pour analyses biochimiques rapides : Le Diagnostest.
Rev. Med. Vet. 1976. 127. 83-92.

23 I.F.C.C.
Quality control in clinical chemitry. Part 1 :
General principles and terminology.
Clin. Chim. Acta. 1979. 98. 129-143.

24 I.F.C.C.
External quality control. Part 5 :
Clin. Chim. Acta. 1979 98. 191-200.

25 I.F.C.C.
Quality control in clinical chemistry. Part 2 :
Assessment of analytical methods for routine use.
Clin. Chim. Acta. 1979; 98. 145-163.

26 RODIER J., MALLEIN R.
Manuel de biochimie pratique à l'usage des laboratoires d'analyses médicales. 3° édition. Paris.Maloine 1968. 420 p.

27 SIEST G., HENNY J., SCHIELE F.
Interpretation des examens de laboratoires.
1° édition. Paris. London. New-york : Karger 1981. 427 p.

28 BERNARD (Serge)
Révision accélérée en biochimie clinique.
1° édition. Paris. Maloine. 1982. 384 p.

29 MORGAN H.C.
Practitionners laboratory manual.
Veterinary Medecine Publishing Co.
Nettelton. Kansas. 1971. 145 p.

30 LEIJNSE B.
Definitive methods - Reference methods (Absolute methods)
Their important impact an clinical chemistry.
Ann. Clin. Biochem. 1982.19 : 289-294.

31 BERNAT O., COLLEMBEL C., DELLAMONICA G., ROUSSELET F.
L'information scientifique du biologiste.
Contrôle pratique des spectrophotomètres. 1981 n°6.

32 LATER R., MONNET L.
Contrôle de qualité des appareils de photométrie.
Lyon Pharmaceutique 1979. 30, 5, 345, 350.

33 SOKOLOWSKI (Gert.)
Quality Control in Medical Laboratories. An Introduction.
Franckfurt. 1978.